



# 铀尾矿土壤细菌与古菌群落结构解析及耐铀菌分离鉴定

曾涛涛, 李利成, 陈真, 高翔, 谭文发, 刘海燕, 王国华  
(南华大学 污染控制与资源化技术湖南省高校重点实验室, 衡阳 421001)

**摘要:** 为了考察铀尾矿土壤中耐铀微生物群落结构, 通过高通量测序技术解析细菌与古菌群落结构, 并从中分离纯化耐铀菌属并进行分子生物学鉴定。通过高通量测序, 分别获得 42706 条细菌和 34346 条古菌的有效序列。微生物 Alpha 多样性分析发现, 细菌种类、群落丰富度与多样性均高于古菌的。通过细菌群落结构解析, 发现 *Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Comamonadaceae* 和 *Cronobacter* 这 4 类菌在铀尾矿土壤中存在, 菌属丰度分别为 3.14%、2.58%、0.83% 和 0.53%。其他优势耐铀菌为 *Bacillus* (49.6%)、*Lactococcus* (31.9%)、*Streptococcus* (2.87%)、*Caulobacter* (0.89%)、*Pseudomonas* (0.72%) 和 *Enterobacter* (0.62%)。通过古菌群落结构解析, 揭示了 *Candidatus Nitrosotalea* (74.03%)、*Methanosaeta* (6.37%)、*Methanobacterium* (3.25%)、*Crenarchaeotic* (3.23%) 和 *Terrestrial Miscellaneous* (1.25%) 这 5 类古菌在铀尾矿土壤中存在及其丰度。从铀尾矿土壤中分离出 5 种耐铀菌属, 分子生物学鉴定发现 A1 和 B2 分别为 *Klebsiella sp.* 和 *Acinetobacter johnsonii* 菌属, 而 C2、D2 及 E2 均属于 *Pseudomonas cedrina* 菌种。

**关键词:** 铀尾矿; 微生物群落; 高通量测序; 古菌

文章编号: 1004-0609(2018)-11-2383-10

中图分类号: X172

文献标志码: A

随着中国核工业的飞速发展, 对放射性铀的需求增大, 对铀矿不断开采与利用造成了铀尾矿的大量积存。铀尾矿是处置铀矿石开采矿渣及其他极低放射性废渣的场所, 具有放射性核素和重金属含量高、污染范围广和危害隐蔽性的特征<sup>[1]</sup>, 如何安全、高效低耗进行铀尾矿污染控制与修复, 成为核工业与环境保护领域的重要课题。

通过微生物修复进行铀污染控制, 具有能耗低、绿色环保特点, 受到研究者广泛重视<sup>[2]</sup>。目前已有较多耐辐射奇球菌<sup>[3]</sup>、硫酸盐还原菌<sup>[4]</sup>、希瓦氏菌<sup>[5]</sup>等微生物对铀进行吸附、还原的报道。然而, 对铀尾矿土壤土著微生物分析<sup>[6]</sup>, 并进行耐铀菌的分离<sup>[7]</sup>, 是进行原位生物修复的基础。王丽超等<sup>[8]</sup>用常规微生物活性评价法和 Biolog 方法研究了铀尾矿区土壤微生物活性及群落功能多样性特征。与普通土壤相比, 尾矿区土壤微生物活性发生了显著变化, 微生物生物量和可培养细菌数量显著降低。彭芳芳等<sup>[9]</sup>采用常规稀释平板法和 Biolog-Eco 微平板方法, 研究了高、中、低污染区的土壤微生物数量, 发现放射性污染从高到低取

样点中, 微生物数量大小为细菌>真菌>放线菌。吴唯民等<sup>[10]</sup>采用基因芯片技术对美国田纳西州橡树岭铀污染地下水的功能微生物进行检测, 发现与 U(VI)还原有关的微生物包括脱硫弧菌、*Desulfosporosinus spp.*、*Anaeromyxobacter spp.* 和土杆菌。

以上研究表明, 铀尾矿中存在能够耐铀的微生物菌(群), 但国内目前尚缺少对铀尾矿土壤中细菌和古菌群落结构深入分析的报道。本文作者通过高通量测序技术, 解析南方某铀尾矿土壤中细菌、古菌多样性与群落结构, 并进行耐铀菌属分离, 以期对铀尾矿区生物修复提供微生物学基础。

## 1 实验

### 1.1 样品采集

采样点位于我国南部某省铀尾矿处置库坝, 刮去表层矿渣后, 选取表层以下 20 cm 位置, 采集 500 g 土壤样品。将土壤样品密封置于冰盒, 立即带回实验

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51408293); 南华大学博士科研启动基金资助项目(2013XQD10); 湖南省研究生科研创新项目(CX2017B535)

收稿日期: 2017-03-24; 修订日期: 2017-11-05

通信作者: 曾涛涛, 副教授, 博士; 电话: 0734-8282312; E-mail: biowater@126.com

室,在-20℃条件下保存备用。经检测,土壤密度为1.03~1.05 g/cm<sup>3</sup>,含水率8.2%~9.0%,土壤中铀浓度为47~60 mg/kg,远超中国土壤环境背景值2.8 mg/kg(铀矿冶辐射防护和环境保护规定 GB 23727—2009)。另外,在样品中检测出镉、铜、锌、铅,这些重金属含量均超过了国家土壤环境质量二级标准。

## 1.2 基因组 DNA 提取与 PCR 扩增

取1 g 铀尾矿土壤,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.0)清洗3次,使用 OMEGA 公司 E.Z.N.A Soil DNA 试剂盒提取微生物基因组 DNA<sup>[11]</sup>。采用细菌 16S rDNA 通用引物 338F/806R 进行 PCR 扩增 V3+V4 区片段<sup>[12]</sup>。使用 TransStart Fastpfu DNA 聚合酶(TransGen AP221-02),20 μL 反应体系,在 ABI GeneAmp® 9700 型 PCR 仪上进行 PCR 操作。扩增程序为:95℃变性3 min;27个扩增循环,包括95℃变性30 s、55℃退火30 s、72℃延伸45 s三个阶段;在72℃终延伸10 min;最后保持在10℃条件待用。采用 524F/Arch958R 扩增古菌 16S rDNA 部分片段<sup>[13]</sup>,扩增循环35次,其他操作条件同细菌 PCR 扩增。每个样本3个重复,将 PCR 产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司)切胶回收 PCR 产物。

## 1.3 高通量测序与数据分析

通过基于 Miseq PE 平台(Illumina,美国)进行高通量测序。测序得到的 PE reads 首先根据 overlap 关系进行拼接,同时对序列质量进行质控和过滤,根据序列之间的相似性 0.97 作为域值划分操作分类单元(OTU)。在 Usearch 软件平台(Version 7.1)进行 OUT 分析,绘制 Rank-Abundance 曲线。计算微生物 Alpha 多样性指数,主要包括 Chao、Ace、Sobs、Shannon、Simpson 和 Coverage 等。另外,对序列进行随机抽样,以抽到的序列数与它们所代表 OTU 的数目构建稀释曲线<sup>[14]</sup>。选用 Silva 数据库进行 16S rRNA 基因序列比对,绘制菌属丰度图。利用 FastTree 软件(Version 2.1.3),选择属水平上分类信息对应的序列,根据最大似然法构建系统发育树。

表 1 细菌与古菌高通量测序结果

Table 1 High-throughput sequencing results of bacteria and archaea

Microorganisms	Sequence number	Average sequence length	Sequence rang of 421-440bp	Sequence rang of 441-460bp	Sequence rang of 461-480bp	Sequence rang of 481-500bp	OUT number
Bacteria	42706	449	2528	40171	0	0	145
Archaea	34346	448	0	33020	240	775	20

## 1.4 耐铀菌分离及其 16S rDNA 鉴定

采用系列稀释法,将1 g 土壤稀溶解于9 mL 水中,然后分别释成 $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 和 $1 \times 10^{-6}$  g/mL 等5个浓度,分别接种到 LB 固体培养基上进行平板划线。经过5代平板划线,将分离的单个菌落接种到液体培养基中,30℃下活化18~24 h。待菌液 OD<sub>600</sub> 值在1~2之间时,以10% (v/v)接种到装有10 mg/L 铀的液体培养基的锥形瓶中,于转速为150 r/min、温度为30℃的条件下震荡培养,测定24 h 后对铀的去除情况。选取除铀效果最好的5种菌,分别命名为 USC A1、USC B2、USC C2、USC D2 和 USC E2。

按照基因组 DNA 提取试剂盒(北京擎科)操作说明进行细菌 DNA 提取,采用引物 27F/1492R 扩增 16S rDNA 基因,PCR 扩增程序为:98℃变性2 min;35个扩增循环,包括98℃变性10 s、55℃退火10 s、72℃延伸20 s三个阶段;在72℃延伸10 min,最后保持在4℃条件待用。对 PCR 扩增结果进行琼脂糖凝胶电泳分析,将 DNA 进行割胶回收及定量检测,在 ABI 3730XL 测序仪测序及拼接。将5个细菌测序结果提交到 Genbank,获得登录号分别为 MF083942、MF083941、MF476206、MF476207 和 MF476208。在 NCBI 数据库中通过 BLAST 工具搜索相似序列,对所得结果通过 Mega 7 软件<sup>[15]</sup>,根据 Neighbor-Joining 方法,比对序列1000次,并计算进化距离,构建系统发育树,完成对耐铀菌的分子生物学鉴定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样本序列与 OTU 分析

对细菌与列菌高通量测序结果进行质控,去除不符合要求的序列,分别获得42706和34346条有效序列,结果如表1所列。细菌平均序长度为449bp,其中序列长度在441~460bp之间有40171条,占总序列的94%;其他有2528条序列长度在421~440bp之间,比例约为6%。古菌平均序列长度为448bp,其中序列长度在441~460bp之间有33020条,占总序列的96%;其他在461~480bp及481~500bp之间的序列数量分别

为 240 与 775。

基于序列相似度 97%划分 OTU, 细菌的 OTU 数量(145)明显多于古菌数量(20), 反映细菌种类更多。统计每个 OTU 所含的序列数, 以此为纵坐标, 以 OTU 等级为横坐标作图, 得到 Rank-Abundance 曲线, 如图 1 所示。在水平方向, 曲线在横轴上的范围越大, 反映物种的丰度越高; 曲线趋势越平缓, 说明物种分布越均匀。由图 1 可知, 细菌的物种丰度和均匀度都比古菌要高, 说明在铀尾矿中细菌是微生物的主要组成部分。

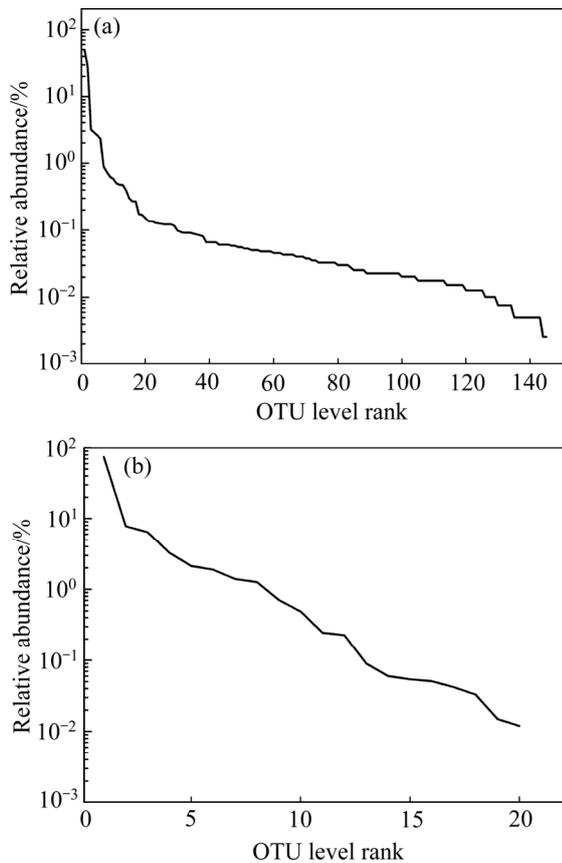


图 1 细菌与古菌 Rank-Abundance 曲线  
Fig. 1 Rank-Abundance curve of bacteria (a) and archaea (b)

2.2 微生物 Alpha 多样性分析

计算不同随机抽样下的 Alpha 多样性指数, 结果如表 2 所列。Coverage 代表取样深度, 细菌 Coverage 为 0.99955, 古菌为 1, 反映样本中序列没有被测出的

概率极低, 非常好地代表样本的真实情况。Ace、Chao 和 Sobs 指数均反映群落丰富度, 且与数值大小正相关。从表 2 可知, 细菌的 Ace、Chao 和 Sobs 明显高于古菌的, 反映细菌群落丰富度要高很多。Shannon 指数和 Simpson 指数均可以反映微生物群落多样性, 多样性大小与 Shannon 指数数值正相关, 但与 Simpson 指数负相关。从表 2 可知, 细菌的 Shannon 较大, Simpson 指数较小, 反映铀尾矿中细菌多样性高于古菌。

样本中随机抽取序列数为横坐标, 分别以相应的 Ace、Chao 和 Sobs 指数为纵坐标, 绘制出丰富度稀疏分析图; 分别以相应的 OTU、Shannon 和 Simpson 指数为纵坐标, 绘制多样性稀疏分析图, 结果如图 2 所示。不管是细菌还是古菌, 丰富度稀疏曲线很快趋向平坦, 说明取样的数量合理, 能很好地反映取样深度。

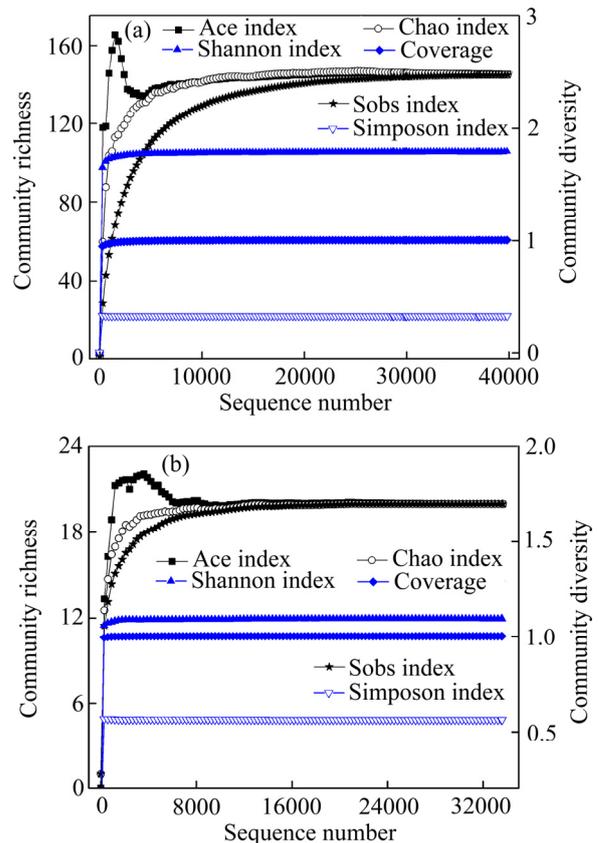


图 2 细菌与古菌 Alpha 多样性分析图  
Fig. 2 Alpha diversity charts of bacteria (a) and archaea (b)

表 2 微生物 Alpha 多样性统计表

Table 2 Alpha index of microbial diversity

Microorganisms	Ace index	Chao index	Sobs index	Coverage index	Shannon index	Simpson index
Bacteria	145.4	145.1	145	0.99995	1.79	0.33
Archaea	20	20	20	1	1.09	0.56

多样性稀疏分析图中序列数量达到或接近饱和, 表明本实验所得的细菌与古菌序列信息能全面地反映微生物多样性。

### 2.3 细菌与古菌群落结构解析

细菌和古菌在属(genus)水平各物种丰度及对应序列数量及如图3所示, 对于所占比例小于0.5%的物种统计总比例, 用“Other”表示。从图3(a)可知, 细菌属比例由大到小分别为 *Bacillus* (49.6%)、*Lactococcus* (31.9%)、*Carnobacterium* (3.14%)、*Streptococcus* (2.87%)、*Enterococcus* (2.58%)、

*Caulobacter* (0.89%)、*Comamondadaceae* (0.83%)、*Pseudomonas* (0.72%)、*Enterobacter* (0.62%) 和 *Cronobacter* (0.53%)。Others 比例为 5.62%, 未知序列 (unclassified) 比例为 0.69%。

*Bacillus* (枯草芽孢杆菌) 是铀尾矿土壤中所占比例最大的细菌, 接近细菌总数的一半, 已有报道发现它具有良好的耐铀能力与铀富集效果, 如马佳林等<sup>[16]</sup>研究发现其对铀的吸附量可达 512.5 mg/g(干重), 吸附过程符合适合 Freundlich 模型; 司慧等<sup>[17]</sup>研究发现, 初始铀浓度为 25~100 mg/L 时, 枯草芽孢杆菌可正常生长, 并且对铀具有富集能力, 主要富集部位为细胞壁,

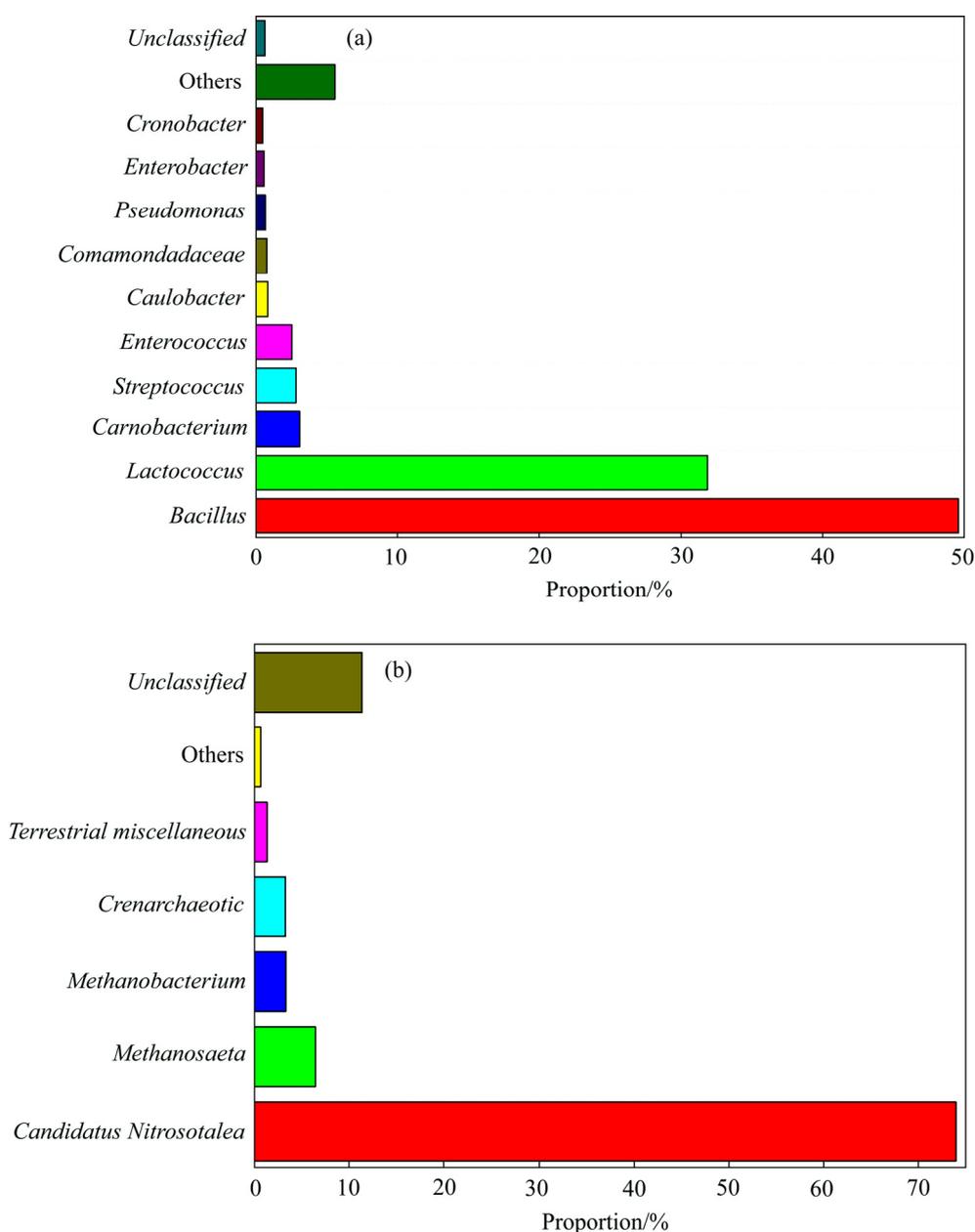


图3 Genus水平上细菌与古菌物种丰度图

Fig. 3 Abundance of microbial species of bacteria (a) and archaea (b) in genus level

约占菌体总吸附量的 89%。*Lactococcus*(乳球菌)是铀尾矿土壤中所占比例第二的细菌, 接近细菌总数的三分之一。OBEID 等<sup>[18]</sup>研究发现, 在铀浓度为 10~150  $\mu\text{mol/L}$  时, 此类菌细胞内的谷胱甘肽能够显著降低铀毒性, 解毒机制是谷胱甘肽中的羧基与 U(VI)螯合形成不溶性的复合物。

*Streptococcus*(链球菌)是土壤中另一类优势菌, 所占比例为 2.87%。MISHRA 等<sup>[19]</sup>将 *Streptococcus lactis* 结合到纳米颗粒上, 进行 U(VI)的吸附研究。结果发现, 铀的吸附量与吸附剂形状有关联, 喷雾干燥的圆环形态结构可获得最大吸附量。10 min 内总摄取量超过  $85\% \pm 2\%$ , 在 pH5.0 和温度 25  $^{\circ}\text{C}$  时, U(VI)的最大吸附容量( $q_{\text{max}}$ )为 169.5 mg/g。*Caulobacter* 菌属所占比例为 0.89%, 此前 BRZOSKA 等<sup>[20]</sup>从铀污染酸性沉积物中分离得到 *Caulobacter sp.* OR37, 与其他 3 种微生物按等比例混合, 在 200  $\mu\text{mol/L}$  含铀培养基中, 经过 30 周培养, 此类微生物仍然为优势菌种, 显示出良好的耐铀能力。

*Pseudomonas*(假单胞菌)所占比例为 0.72%, 许多研究发现 *Pseudomonas* 对铀具有很高的吸附效果与耐受能力<sup>[21]</sup>。庞园涛等<sup>[22]</sup>对十红滩铀矿中假单胞菌多样性进行研究, 结果表明经过生理生化实验及 16S rDNA 基因序列鉴定, 其中可培养的假单胞菌主要为 *Pseudomonas stutzeri* 和 *Pseudomonas putida*, 而 PCR-DGGE 显示 *Pseudomonas stutzeri* 是该矿床中的优势假单胞菌。*Enterobacter*(肠杆菌属)所占比例为 0.62%。该菌属曾在铀尾矿库中出现<sup>[23]</sup>, 其能够产生胞外多聚物, 可有效降低铀毒性<sup>[24]</sup>, 对其他重金属也具有良好的耐受能力<sup>[25]</sup>。

此外还有 4 种菌, *Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Comamonadaceae* 和 *Cronobacter*, 它们此前没有在含铀环境中的报道。*Carnobacterium* 属于肉食杆菌属, 革兰氏阳性无芽孢。*Enterococcus* 为肠球菌属, 革兰氏阳性, 细胞球形或卵圆形, 兼性厌氧微生物。*Comamonadaceae* 和 *Cronobacter* 文献报道较少。本文通过高通量测序技术, 发现了此前从未在铀尾矿中报道的菌属, 验证了高通量测序是一种能够有效检测微生物多样性的分子生物学技术, 可以深度挖掘非培养菌属信息。

从图 3(b)可知, 古菌菌属组成较简单, 按比例由大到小分别为 *Candidatus Nitrosotalea* (74.03%)、*Methanosaeta* (6.37%)、*Methanobacterium* (3.25%)、*Crenarchaeotic* (3.23%) 和 *Terrestrial Miscellaneous* (1.25%)。另外未知序列比例之和为 11.29% (unclassified), others(单个菌属比例小于 0.5%的物种

统计)比例为 0.58%。*Candidatus Nitrosotalea* 为候选硝化古菌, 周志成等<sup>[26]</sup>研究不同施肥方式对红壤蔬菜田氨氧化细菌和氨氧化古菌群落的影响时, 曾发现此类菌存在, 在土壤氨氧化过程中起着重要的作用。*Methanosaeta* 为甲烷鬃菌, SOMENAHALLY 等<sup>[27]</sup>在研究 Cr(VI)对微生物群落结构影响中发现此类菌的存在, 但在高 Cr(VI)浓度下, 甲烷古菌受到抑制。*Methanobacterium* 为甲烷杆菌, 易敏等<sup>[28]</sup>研究了处理造纸废水的颗粒污泥菌群结构特性, 发现颗粒污泥中 Cr(32.3 mg/kg)、Mn(1850.2 mg/kg)、As(95.1 mg/kg)和 Zn(761.8 mg/kg)含量很高时, *Methanobacterium* 古菌丰度可达 4.68%, 显示出较强的耐受重金属毒性能力。*Crenarchaeotic* 为泉古菌, 它和 *Terrestrial Miscellaneous* 通常在海洋沉积物中出现<sup>[29]</sup>。

此前尚未有以上古菌在铀尾矿土壤中的报道, 而本实验发现它们能在铀辐射环境中生存。古菌的细胞结构与细菌显著不同, 由于独特的生理特性, 绝大多数的古菌都无法在实验室中纯化培养。因此, 对于其在铀环境中的生态功能与耐铀机理, 后续需要通过环境基因组或基因芯片检测技术深入分析。

## 2.4 细菌与古菌系统发育树分析

对菌属所占比例高于 0.5%的细菌与古菌, 分别构建系统发育树, 结果如图 4 所示, 其中各菌属所包含的序列数量可参考比例尺。同一分支代表亲缘关系较近, 不同分支则同源性相对较低。由图 4(a)可知, 细菌的系统发育树可分成两大支, 代表铀尾矿土壤中优势菌属可以分成两大簇。*Caulobacter*、*Comamonadaceae*、*Pseudomonas*、*Enterobacter* 和 *Cronobacter* 为同一簇, 它们之间亲缘关系较近, 而这 5 种菌所占比例都不高, 在 0.53%到 0.89%之间。其中, *Enterobacter* 和 *Cronobacter* 在更细小的分支上, 代表它们之间亲缘关系更近。

另外一大簇包含 *Bacillus*、*Lactococcus*、*Carnobacterium*、*Streptococcus* 和 *Enterococcus*, 它们所占比例较大, 从 49.6%到 2.58%不等, 在铀尾矿土壤中优势明显。其中, *Lactococcus* 和 *Streptococcus* 在同一个细小分支上, 代表它们的亲缘关系更近。同样地, *Carnobacterium* 和 *Enterococcus* 亲缘关系也很近。

古菌的系统发育树也分成两大支, 其中 *Candidatus Nitrosotalea*、*Crenarchaeotic* 和 *Terrestrial Miscellaneous* 为一簇, 亲缘关系较近, 它们比例之和为 78.78%。而 *Methanosaeta* 和 *Methanobacterium* 为同一簇, 因为它们都是甲烷菌, 所以亲缘关系接近, 它们比例之和为 9.62%。与细菌相比, 古菌的系统发

育树也更简单。

## 2.5 耐铀菌分离、鉴定

将分离获得的5个耐铀菌属 USC A1、USC B2、USC C2、USC D2 和 USC E2, 接种到 10 mg/L 含铀液体培养基中, 考察 24 h 内铀的去除情况。结果发现这

5 种菌对铀的去除率最高分别可达到 99.0%、94.7%、96.2%、99.3%和 94.7%, 显示出高效除铀效果, 表明它们具有良好的铀尾矿原位修复潜力。将这 5 种细菌的 16S rDNA, 通过 Blast 工具搜索相似序列, 结果如表 3 所列。

USC A1、USC B2 分别与 *Klebsiella sp.* NCCP-141

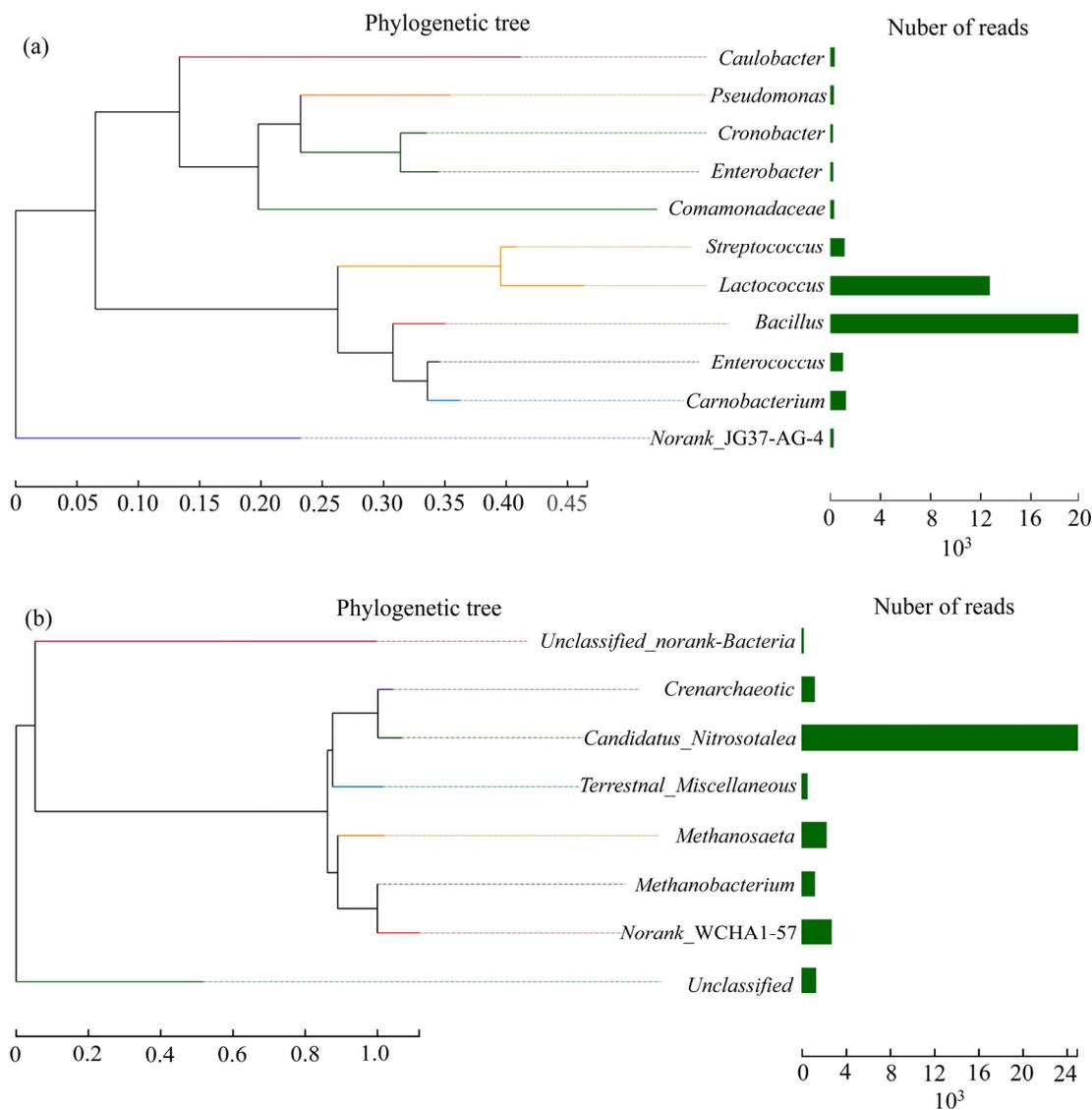


图 4 基于高通量测序结果的铀尾矿细菌与古菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic trees of bacteria (a) and archaea (b) in uranium tailings based on high through-put sequencing

表 3 耐铀菌 16S rDNA 序列相似性分析

Table 3 Similarity analysis of uranium-resistant bacterial 16S rDNA sequences

Isolated bacteria	Accession number	The most closed genus	Accession number	Similarity/%
USC A1	MF083942	<i>Klebsiella sp.</i> NCCP-141	AB558500.1	99
USC B2	MF083941	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain SP171	JN409466.1	99
USC C2	MF476206	<i>Pseudomonas cedrina</i> strain Y37	JX113244.1	99
USC D2	MF476207	<i>Pseudomonas cedrina</i> strain Y37	JX113244.1	99
USC E2	MF476208	<i>Pseudomonas cedrina</i> strain -Y310	JX113239.1	99

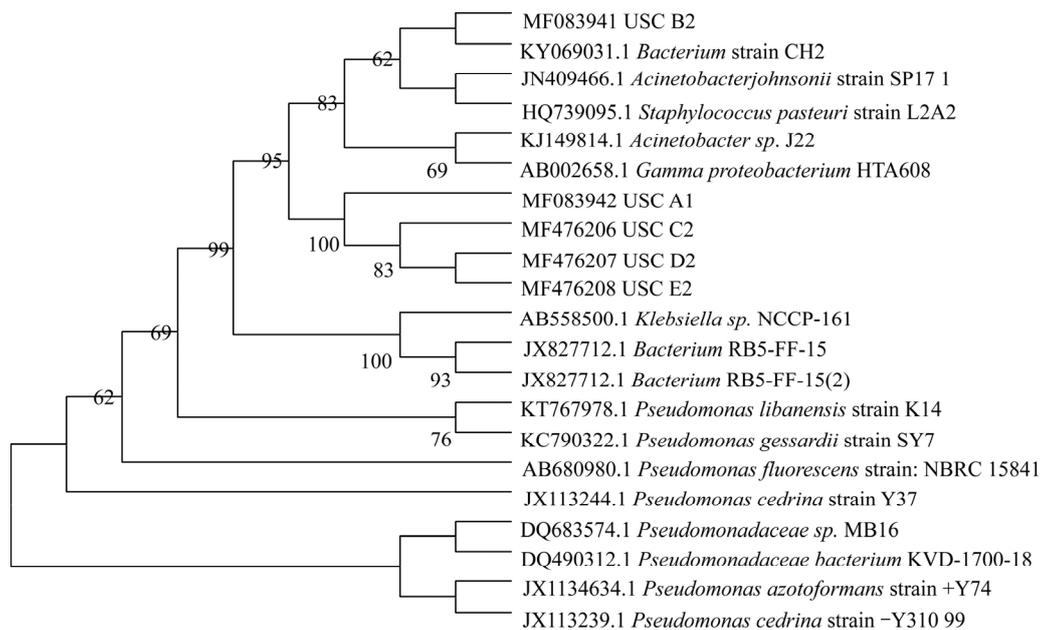


图 5 根据 16S rDNA 构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on 16S rDNA

(AB558500.1) 和 *Acinetobacter johnsonii* strain SP171(JN409466.1)最相似, 相似度均为 99%; USC C2 和 USC D2 均与 *Pseudomonas cedrina* strain Y37(JX113244.1)最相似, 相似度为 99%; USC E2 与 *Pseudomonas cedrina* strain-Y310(JX113239.1)最相似, 相似度为 99%。由此可知, USC A1 和 USC B2 分别为 *Klebsiella sp.*和 *Acinetobacter johnsonii* 菌属, 而 USC C2、USC D2 及 USC E2 可认为均属于 *Pseudomonas cedrina* 菌种。

将 5 种菌及其相似菌属序列, 通过 Mega 7 软件构建系统发育树, 结果如图 5 所示。从系统发育树结果可知, USC A1、USC C2、USC D2 和 USC E2 在同一分支上, 形成一组, 它们的进化关系较近。而 USC B2 与其他 4 种耐铀菌不在同一分支上面, 进化关系较远。A1 和 B2 代表的菌属, 在 2.3 部分细菌群落结构分析时, 并没有出现, 表面这 2 种菌原来在铀尾矿土壤中所占比例低于 0.5%。

*Klebsiella sp.*为克雷伯氏菌属, 属于固氮菌, 庞园涛等<sup>[30]</sup>曾在十红滩铀矿床地下水与矿石中分离得到此类细菌, 它们与元素 N 的循环密切相关。*Acinetobacter johnsonii* 属于不动杆菌属, ISLAM 等<sup>[31]</sup>研究了深地层铀矿细菌多样性、金属抗性、与固铀能力, 分离获得 *Acinetobacter* 菌属, 发现它对 Ni、Zn、Cu 和 Hg 具有良好的抗性, 且有较高的固铀能力, 在 48 h 内除铀能力达到 50 mg/g 细胞干重。*Pseudomonas cedrina* 属于假单胞菌, 目前已有许多报道发现它们具

有良好的铀去除能力<sup>[21-22]</sup>。

### 3 结论

1) 细菌与古菌高通量测序, 分别获得 42706 和 34346 条有效序列。细菌的 OTU 数量(145)明显多于古菌(20), 细菌的 Ace、Chao 和 Sobs 指数也明显高于古菌, 反映细菌种类及群落丰富度要高很多。从 Shannon 与 Simpson 指数可知, 铀尾矿中细菌群落多样性也高于古菌。

2) 耐铀细菌菌属比例由大到小分别为 *Bacillus* (49.6%)、*Lactococcus* (31.9%)、*Carnobacterium* (3.14%)、*Streptococcus* (2.87%)、*Enterococcus* (2.58%)、*Caulobacter* (0.89%)、*Comamondadaceae* (0.83%)、*Pseudomonas* (0.72%)、*Enterobacter* (0.62%) 和 *Cronobacter* (0.53%)。*Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Comamondadaceae* 和 *Cronobacter* 为首次发现在铀尾矿土壤中存在。

3) 古菌菌属种类较简单, 按比例由大到小分别为 *Candidatus Nitrosotalea* (74.03%)、*Methanosaeta* (6.37%)、*Methanobacterium* (3.25%)、*Crenarchaeotic* (3.23%)和 *Terrestrial Miscellaneous* (1.25%)。此前尚未有以上古菌在铀尾矿土壤中的报道, 其生态功能与耐铀机理有待后续研究。

4) 从铀尾矿土壤中分离出 5 种耐铀菌属, USC A1

和 USC B2 分别为 *Klebsiella sp.* 和 *Acinetobacter johnsonii* 菌属, 而 USC C2、USC D2 及 USC E2 均属于 *Pseudomonas cedrina* 菌种。它们在 24 h 内, 对 10 mg/L 铀的去除率最高分别可达到 99.0%、94.7%、96.2%、99.3%和 94.7%, 显示出高效除铀效果, 表明它们具有良好的铀尾矿原位修复潜力。

## REFERENCES

- [1] 张彪, 张晓文, 李密, 唐东山, 吕俊文, 谭文发. 铀尾矿污染特征及综合治理技术研究进展[J]. 中国矿业, 2015, 24(4): 58–62.  
ZHANG Biao, ZHANG Xiao-wen, LI Mi, TANG Dong-shan, LÜ Jun-wen, TAN Wen-fa. The characteristics and research progress of uranium tailing comprehensives treatments techniques[J]. China Mining Magazine, 2015, 24(4): 58–62.
- [2] HU N, DING D X, LI S M, TAN X, LI G Y, WANG Y D, XU F. Bioreduction of U(VI) and stability of immobilized uranium under suboxic conditions[J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2016, 154: 60–67.
- [3] 肖方竹, 何淑雅, 彭国文, 唐艳, 戴益民. 功能化磁性载体固定耐辐射奇球菌及其对铀的吸附行为与机理[J]. 中国有色金属学报, 2016, 26(7): 1568–1575.  
XIAO Fang-zhu, HE Shu-ya, PENG Guo-wen, TANG Yan, DAI Yi-min. Adsorption behavior and mechanism of uranium (VI) on *Deinococcus radiodurans* immobilized functionalization magnetic carrier[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2016, 26(7): 1568–1575.
- [4] 刘金香, 谢水波, 马华龙, 王永华, 陈华柏, 李标. 零价铁对奥奈达希瓦氏菌还原 U(VI)的影响及机制[J]. 中国有色金属学报, 2015, 25(8): 2309–2315.  
LIU Jin-xiang, XIE Shui-bo, MA Hua-long, WANG Yong-hua, CHEN Hua-bai, LI Biao. Effect and mechanism of zero-valent iron on reducing U(VI) by *S. Oneidensis* [J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2015, 25(8): 2309–2315.
- [5] 谢水波, 陈胜, 马华龙, 唐振平, 曾涛涛, 凌辉, 吴宇琦. 硫酸盐还原菌颗粒污泥去除 U(VI)的影响因素及稳定性[J]. 中国有色金属学报, 2015, 25(6): 1713–1720.  
XIE Shui-bo, CHEN Sheng, MA Hua-long, TANG Zhen-ping, ZENG Tao-tao, LING Hui, WU Yu-qi. Influence factors and stability of U(VI) removal by sulfate reducing bacteria granular sludge[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2015, 25(6): 1713–1720.
- [6] YAN X, LUO X, ZHAO M. Metagenomic analysis of microbial community in uranium-contaminated soil[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(1): 299–310.
- [7] SANCHEZ-CASTRO I, AMADOR-GARCIA A, MORENO-ROMERO C, LOPEZ-FERNANDEZ M, PHROMMAVANH V, NOS J, DESCOSTES M, MERROUN M L. Screening of bacterial strains isolated from uranium mill tailings porewaters for bioremediation purposes[J]. J Environ Radioact, 2017, 166(Pt 1): 130–141.
- [8] 王丽超, 罗学刚, 彭芳芳, 赵鲁雪. 铀尾矿污染土壤微生物活性及群落功能多样性变化[J]. 环境科学与技术, 2014, 37(3): 25–31.  
WANG Li-chao, LUO Xue-gang, PENG Fang-fang, ZHAO Lu-xue. Change of microbial activity and functional diversity of contaminated soil microbes community in uranium tailings [J]. Environment Science & Technology, 2014, 37(3): 25–31.
- [9] 彭芳芳, 罗学刚, 王丽超, 赵鲁雪. 铀尾矿周边污染土壤微生物群落结构与功能研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(11): 2192–2198.  
PENG Fang-fang, LUO Xue-gang, WANG Li-chao, ZHAO Lu-xue. Microbial community structure and function in soils around uranium tailings[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(11): 2192–2198.
- [10] 吴唯民, CARLEY J, WATSON D, 顾宝华, BROOKS S, D.KELLY S, KEMNER K, NOSTRAND J D V, 吴力游, 许玫英, 周集中, 罗剑, CARDENAS E, 黄家琪, W.FIELDS M, L.MARSH T, M.TIEDJE J, J.GREEN S, E.KOSTKA J, K.KITANIDIS P, M.JARDINE P, S.CRIDDLE C. 地下水铀污染的原位微生物还原与固定:在美国能源部田纳西橡树岭放射物污染现场的试验[J]. 环境科学学报, 2011, 31(3): 449–459.  
WU Wei-min, CARLEY J, WATSON D, GU Bao-hua, BROOKS S, D.KELLY S, KEMNER K, NOSTRAND J D V, WU Li-you, XU Mei-ying, ZHOU Ji-zhong, LUO JIAN, CARDENAS E, HUANG Jia-qi, W.FIELDS M, L.MARSH T, M.TIEDJE J, J.GREEN S, E.KOSTKA J, K.KITANIDIS P, M.JARDINE P, S.CRIDDLE C. Bioreduction and immobilization of uranium in situ: A case study at a USA department of energy radioactive waste site, Oak Ridge, Tennessee[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2011, 31(3): 449–459.
- [11] 曾涛涛, 鲁慧珍, 刘迎九, 刘金香, 荣丽杉, 马华龙, 谢水波. 耐铀颗粒污泥微生物群落结构解析[J]. 中国有色金属学报, 2016, 26(1): 233–241.  
ZENG Tao-tao, LU Hui-zhen, LIU Ying-jiu, RONG Li-shan, MA Hua-long, XIE Shui-bo. Analysis of microbial community structure of uranium-resistant granular sludge[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2016, 26(1): 233–241.
- [12] 张恩华, 戴幼芬, 肖勇, 陈必链, 杨朝晖, 赵峰. 还原 Cr(VI)的混菌胞外聚合物和细菌群落结构分析[J]. 中国环境科学, 2017, 37(1): 352–357.  
ZHANG En-hua, DAI You-fen, XIAO Yong, CHEN Bi-lian, YANG Zhao-hui, ZHAO Feng. Analysis of extracellular polymeric substances and bacterial community in mixed cultures for Cr(VI) reduction[J]. China Environment Science, 2017, 37(1): 352–357.
- [13] YANG Y, LI Y, SUN Q-Y. Archaeal and bacterial communities in acid mine drainage from metal-rich abandoned tailing ponds, Tongling, China[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2014, 24(10): 3332–3342.

- [14] 曾涛涛, 廖伟, 谢水波, 荣丽杉, 李仕友, 蒋小梅, 马华龙. 柠檬酸废水厌氧颗粒污泥微生物菌群结构解析[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2016, 48(8): 115-120.  
ZENG Tao-tao, LIAO Wei, XIE Shui-bo, RONG Li-shan, LI Shi-you, JIANG Xiao-mei, MA Hua-long. Analysis of bacterial community in anaerobic granular sludge for citric acid wastewater treatment[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2016, 48(8): 115-120.
- [15] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [16] 马佳林, 聂小琴, 董发勤, 代群威, 张东, 杨杰, 周娴, 黄荣, 龚俊源, 龚运军. 三种微生物对铀的吸附行为研究[J]. 中国环境科学, 2015, 35(3): 825-832.  
MA Jia-lin, NIE Xiao-qin, DONG Fa-qin, DAI Qun-wei, ZHANG Dong, YANG Jie, ZHOU Xian, HUANG Rong, GONG Jun-yuan, GONG Yun-jun. The adsorption behavior on uranium by three kinds of microorganisms[J]. China Environment Science, 2015, 35(3): 825-832.
- [17] 司慧, 罗学刚, 望子龙, 包文庆, 韩旭. 枯草芽孢杆菌对铀的富集及机理研究[J]. 中国农学通报, 2017, 33(8): 31-38.  
SI Hui, LUO Xue-gang, WANG Zi-long, BAO Wen-qing, HAN Xu. Biosorption of uranium by *Bacillus subtilis* and its mechanism[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(8): 31-38.
- [18] OBEID M H, OERTEL J, SOLIOZ M, FAHMY K. Mechanism of Attenuation of Uranyl Toxicity by Glutathione in *Lactococcus lactis*[J]. Applied And Environmental Microbiology, 2016, 82(12): 3563-3571.
- [19] MISHRA A, MELO J S, SEN D, D'SOUZA S F. Evaporation induced self assembled microstructures of silica nanoparticles and *Streptococcus lactis* cells as sorbent for uranium (VI)[J]. Journal of Colloid And Interface Science, 2014, 414(2): 33-40.
- [20] BRZOSKA R M, BOLLMANN A. The long-term effect of uranium and pH on the community composition of an artificial consortium[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016, 92(1): 1-14.
- [21] CHOUDHARY S, SAR P. Uranium biomineralization by a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from contaminated mine waste[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186(1): 336-343.
- [22] 庞园涛, 朱艳杰, 张晓, 张珺, 黄建新, 乔海明. 十红滩铀矿中可培养假单胞菌多样性[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(7): 1743-1749.  
PANG Yuan-tao, ZHU Yan-jie, ZHANG Xiao, ZHANG Jun, HUANG Jian-xin, QIAO Hai-ming. The species of cultured *Pseudomonas* in Shihongtan uranium ore[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(7): 1743-1749.
- [23] 朱捷, 何微, 陈晓明, 刘梅, 张娥, 柳芳, 陈浩. 湖南衡阳铀尾矿库中微生物分布调查及优势菌鉴定[J]. 安全与环境学报, 2013, 13(-1): 108-112.  
ZHU Jie, HE Wei, CHEN Xiao-ming, LIU Mei, ZHANG E, LIU Fang, CHEN Hao. Investigation of the microbial distribution and identification of single isolates of uranium tailings impoundment in Hunan [J]. Journal of Safety and Environment, 2013, 13(1): 108-112.
- [24] NAGARAJ K, DEVASYA R P, BHAGWATH A A. Exopolysaccharide produced by *Enterobacter sp* YG4 reduces uranium induced nephrotoxicity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 557-561.
- [25] HACIOGLU N, TOSUNOGLU M. Determination of antimicrobial and heavy metal resistance profiles of some bacteria isolated from aquatic amphibian and reptile species[J]. Environmental monitoring and assessment, 2014, 186(1): 407-413.
- [26] 周志成, 罗葵, 唐前君, 荣湘民, 刘强, 何飞飞. 不同施肥方式对红壤蔬菜田氨氧化细菌和氨氧化古菌群落的影响[J]. 中国蔬菜, 2015, 1(7): 33-39.  
ZHOU Zhi-cheng, LUO Kui, TANG Qian-jun, RONG Xiang-min, LIU Qiang, HE Fei-fei. Effect of different fertilization on Ammonia-oxidizing bacteria and Ammonia-oxidizing archaea in red soil vegetable field[J]. China Vegetables, 2015, 1(7): 33-39.
- [27] SOMENAHALLY A C, MOSHER J J, YUAN T, PODAR M, PHELPS T J, BROWN S D, YANG Z K, HAZEN T C, ARKIN A P, PALUMBO A V, VAN NOSTRAND J D, ZHOU J Z, ELIAS D A. Hexavalent chromium reduction under fermentative conditions with lactate stimulated native microbial communities[J]. PloS One, 2013, 8(12): e83909.
- [28] 易敏, 蒋亚蕾, 王双飞, 杨珍珍, 章哲韵, 王志伟. 两种造纸废水的厌氧内循环反应器内颗粒污泥菌群及结构特性的对照分析[J]. 造纸科学与技术, 2017, 36(3): 72-78.  
YI Min, JIANG Ya-lei, WANG Shuang-fei, YANG Zhen-zhen, ZHANG Zhe-yun, WANG Zhi-wei. Analysis of dominant bacterial community structures in IC reactors for treating two different papermaking wastewaters from wastepaper recycling and bagasse pulping[J]. Paper Science & Technology, 2017, 36(3): 72-78.
- [29] 李涛, 王鹏, 汪品先. 南海西沙海槽表层沉积物微生物多样性[J]. 生态学报, 2008, 28(3): 1166-1173.  
LI Tao, WANG Peng, WANG Pin-xian. Microbial diversity in surface sediments of the Xi sha Trough the South of China Sea[J]. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(3): 1166-1173.
- [30] 庞园涛. 十红滩铀矿床地下水与矿石中细菌类群分布特征研究[D]. 西安: 西北大学, 2016: 23.  
PANG Yuan-tao. Distribution characteristics of bacteria in Shihongtan uranium deposit Groundwater and ore[D]. Xi'an: Northwest University, 2016: 23.
- [31] ISLAM E, SAR P. Diversity, metal resistance and uranium sequestration abilities of bacteria from uranium ore deposit in deep earth stratum [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 127(3): 12-21.

## Microbial community of bacteria and archaea analysis in uranium tailing and uranium-resistant bacteria isolation

ZENG Tao-tao, LI Li-cheng, CHEN Zhen, GAO Xiang, TAN Wen-fa, LIU Hai-yan, WANG Guo-hua

(Hunan Province Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse Technology,  
University of South China, Hengyang 421001, China)

**Abstract:** In order to investigate the uranium-resistant microbial communities in uranium tailings, high-throughput sequencing technique was used to analyze the community structure of bacteria and archaea. And isolation and identification of uranium-resistant bacteria were carried out. The results show that, after high-throughput sequencing, sequences of 42706 and 34346 are available for bacteria and archaea with high quality, respectively. Microbial alpha diversity analysis reveals that there are much higher microbial diversity, abundance and richness of bacteria than that of archaea. According to microbial community analysis of bacteria, it is the first report of *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Comamonadaceae* and *Cronobacter* in uranium tailings, which occupy 3.14%, 2.58%, 0.83% and 0.53% of the bacterial abundance, respectively. It also reveals other dominant uranium-resistant bacteria of *Bacillus* (49.6%), *Lactococcus* (31.9%), *Streptococcus* (2.87%), *Caulobacter* (0.89%), *Pseudomonas* (0.72%) and *Enterobacter* (0.62%). Besides that, according to microbial community analysis of archaea, it is the first time to show the dominant archaea genus of *Candidatus Nitrosotalea* (74.03%), *Methanosaeta* (6.37%), *Methanobacterium* (3.25%), *Crenarchaeotic* (3.23%) and *Terrestrial Miscellaneous* (1.25%) are available in the uranium tailings with certain abundance. In addition, five uranium-resistant bacterial genera are isolated, and molecular technique identification shows A1 and B2 are similarity with *Klebsiella* sp. and *Acinetobacter johnsonii*, respectively. And C2, D2 and E2 belong to the species of *Pseudomonas cedrina*.

**Keywords:** uranium tailings; microbial community; high-throughput sequencing; archaea

**Foundation item:** Project(51408293) supported by the National Natural Science Foundation of China; Project (2013XQD10) supported by the Scientific Research Staring Foundation for Doctoral Program in University of South China; Project (CX2017B535) supported by the Graduate Scientific Innovation Research Project of Hunan Province, China

**Received date:** 2017-08-24; **Accepted date:** 2017-11-05

**Corresponding author:** ZENG Tao-tao; Tel: +86-734-8282312; E-mail: biowater@126.com

(编辑 何学锋)